

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06220088 A**

(43) Date of publication of application: **09 . 08 . 94**

(51) Int. Cl

C07K 5/08

A23L 1/305

// A61K 37/64

A61K 37/64

(21) Application number: **05025977**

(71) Applicant: **ASAHI CHEM IND CO LTD**

(22) Date of filing: **22 . 01 . 93**

(72) Inventor: **MITSUFUJI KAZUE
KAMATA TOMOKO**

(54) **TRIPEPTIDE INHIBITING ANGIOTENSIN I
CONVERTING ENZYME, ITS PRODUCTION AND
FOOD CONTAINING THE TRIPEPTIDE**

fluorenylmethoxy carbonyl)-amino acid, t-Boc(t-butoxycarbonyl)-amino acid, etc., the synthesized peptide is subjected to the removal from the solid phase and the elimination of the protecting groups and the product is treated with an anion exchange resin column and purified by reversed phase high-performance liquid chromatography to obtain the objective tripeptide effective for inhibiting angiotensin I converting enzyme and having the structure of Leu-Arg-(Trp, Phe, Thr), Ile-Arg-(Phe, Tyr), Ile-Lys-Phe, Phe-Arg-(Pro, Trp, Phe, Tyr) and Phe-Lys-(Trp, Phe, Tyr).

(57) Abstract:

PURPOSE: To provide a new tripeptide having a specific amino acid sequence, inhibiting angiotensin I converting enzyme, exhibiting hypotensive action and low side-action and useful as an agent for the treatment of hypertension, foods, etc.

CONSTITUTION: A peptide is synthesized on a solid-phase supporting member by a solid-phase peptide synthesis process using Fmoc(9-

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-220088

(43)公開日 平成6年(1994)8月9日

(51)Int.Cl.⁵

C 0 7 K 5/08

A 2 3 L 1/305

// A 6 1 K 37/64

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

8318-4H

A B U

8314-4C

A E Q

8314-4C

審査請求 未請求 請求項の数 3 FD (全 4 頁)

(21)出願番号

特願平5-25977

(71)出願人

旭化成工業株式会社

(22)出願日

平成5年(1993)1月22日

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72)発明者

三藤一恵

静岡県富士市駿島2番地の1 旭化成工業

株式会社内

(72)発明者

鎌田朋子

静岡県富士市駿島2番地の1 旭化成工業

株式会社内

(74)代理人

弁理士 清水猛 (外1名)

(54)【発明の名称】 アンジオテンシンⅠ変換酵素を阻害するトリペプチドおよびその製造法ならびにそれを含む食品

(57)【要約】 (修正有)

【構成】 Leu-Arg-Trp, Leu-Arg-Phe, Leu-Arg-Tyr, Ile-Arg-Ph e, Ile-Arg-Tyr, Ile-Lys-Ph e, Phe-Arg-Pro, Phe-Arg-Tr p, Phe-Arg-Phe, Phe-Arg-Ty r, Phe-Lys-Trp, Phe-Lys-Ph e, Phe-Lys-Tyrの構造を持つアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害ペプチドであって、化学合成法で製造できる。これらは各種の食品、医薬品に応用できる。

【効果】 上記のトリペプチドはアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害作用を示すので、血圧降下作用があり、副作用も少ない。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記構造を有するアンジオテンシンI変換酵素阻害ペプチド。

L e u - A r g - T r p

L e u - A r g - P h e

L e u - A r g - T y r

I l e - A r g - P h e

I l e - A r g - T y r

I l e - L y s - P h e

P h e - A r g - P r o

P h e - A r g - T r p

P h e - A r g - P h e

P h e - A r g - T y r

P h e - L y s - T r p

P h e - L y s - P h e

P h e - L y s - T y r

【請求項2】 化学合成法により合成することを特徴とする請求項1記載の構造を有するアンジオテンシンI変換酵素阻害ペプチドの製造法。

【請求項3】 請求項1記載の構造を有するアンジオテンシンI変換酵素阻害ペプチドを少なくとも1種類含む食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アンジオテンシンI変換酵素阻害ペプチドおよび同ペプチドの製造および利用法に関する。

【0002】

【従来の技術】 高血圧症は、最大血圧が160mmHg以上か、最小血圧が95mmHg以上または両者がそれ以上の状態である。わが国では患者数が約2000万人であるといわれ、り患率の高い疾病である。高血圧症は、脳出血、脳梗塞、クモ膜下出血、狭心症、心筋梗塞、腎硬化症、腎不全、網膜静脈閉塞症など広範囲の臓器にわたって様々な合併症を生じることが知られており、有効な治療薬が望まれている。

【0003】 生体内において血圧を調節するメカニズムの一つとして、昇圧系であるレニン・アンジオテンシン系と降圧系であるカリクリエン・キニン系がある。レニン・アンジオテンシン系では酵素レニンが腎臓の傍球体細胞（J.G細胞）で生成され、血管でレニン基質であるところのアンジオテンシンノーゲンに作用してアンジオテンシンIを生成する。このアンジオテンシンIをアンジオテンシンIIに変換する酵素がアンジオテンシンI変換酵素であり、生じたアンジオテンシンIIは細動脈に作用して収縮を起こさせる。

【0004】 また、アンジオテンシンIIは副腎皮質にも作用してアルドステロンの合成と分泌を促し、腎臓でのナトリウムの再吸収を促進し、体液量を保持する働きもある。このようにしてアンジオテンシンIIによつて

血圧が上昇する。一方、カリクリエン・キニン系では、蛋白分解酵素であるカリクリエンが、基質であるところのキニノーゲンに作用してキニンを生じる。キニンは血管を拡張させ、血圧を下げる働きを有するが、キニナーゼIIによって分解を受ける。キニナーゼIIはアンジオテンシンI変換酵素と同一物質であることが知られている。以上のことから、アンジオテンシンI変換酵素を阻害することによる高血圧の治療を行うことができると考えられる。

10 【0005】 この考え方により現在カブトブリル、エナラブリル、アラセブリル等の合成医薬が開発されている。また、天然物からはカゼインやゼラチン、魚肉、家畜の血液などに由来するペプチドもアンジオテンシン変換酵素を阻害する働きがあることが知られている。（特開昭59-44324号、特開昭64-5497号、特開平01-313498号）

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 カブトブリルは、内服で強力な血圧降下作用を示す。しかし、使用量が不適当であると腎機能障害や低血圧をもたらす。また、分子内に存在するSH基のため、発疹や味覚異常を引き起こすとも言われている。安価な天然物を原料とするアンジオテンシンI変換酵素阻害物質であるカゼイン、ゼラチン、魚肉などに由来するペプチドは、分離精製が困難な上、収率が悪い。

【0007】 本発明では、アンジオテンシンI変換酵素を阻害するペプチドを見い出し、同ペプチドの製造法を確立し、これを応用した食品を開発することにより、本発明を完成した。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明は、アンジオテンシンI変換酵素阻害ペプチドおよびその製造法ならびにそれを含む食品に関する。

【0009】 本ペプチドは、F m o c (9-フルオレニルメチルオキシカルボニル) -アミノ酸やt-B o c (t-ブロキシカルボニル) -アミノ酸などを用いる固相合成法、プロテアーゼを用いるペプチド合成法など全ての既知の化学合成法【生化学実験講座1、タンパク質の化学I V 第11部 ペプチド合成（P. 205）】

40 日本化学会編 東京化学同人、続生化学実験講座2 タンパク質の化学I、20章ペプチド合成（P. 641），日本化学会編 東京化学同人】で製造することができる。

【0010】

【実施例】 以下、実施例により本発明を具体的に説明する

実施例1

アブライドバイオシステム社のペプチド合成機ペプチドシンセサイザー430Aを用いて、同社の操作マニュアルに従い、配列表1から13で表されるペプチド

を合成した。ペプチドを抽出し、陰イオン交換樹脂カラム処理後、ODSカラムを用いた逆相HPLCにより、本発明のペプチドを精製した。アミノ酸組成を測定した結果、ペプチドの配列から期待される値とよく一致した。

【0011】【アンジオテンシンI変換酵素阻害活性の測定】アンジオテンシンI変換酵素阻害の測定は、カッシュマンらの方法（バイオケミカル・ファーマコロジー20巻1637～1648頁（1971））を改良した丸山らの方法（アグリカルチュアル・バイオロジカル・ケミストリー46巻5号（1393～1394（1982））に従った。

【0012】試験管に本ペプチド水溶液 $3.0\ \mu\text{l}$ と酵素基質として、L-ヒブリルヒスチジルロイシン（シグマ社製）とNaClを含有したpH8.3のほう酸バッファー $2.50\ \mu\text{l}$ を加えて、37°Cで10分間ブレインキュベーションした。その後、アンジオテンシンI変換酵素含有液 $1.00\ \mu\text{l}$ を加え、酵素反応を開始した。この時ほう酸バッファーの濃度は0.1M、L-ヒブリルヒスチジルロイシン濃度は5mM、NaCl $3.00\ \text{mM}$ であり、阻害がかからない場合の酵素活性は、8mUである。

【0013】37°C、pH8.3で30分間インキュベートしながら反応させた後、1NHC $1.250\ \mu\text{l}$ を加えて反応を停止させた。なお、盲検としては、アンジオテンシンI変換酵素含有液を加える前に1NHC $1\ \mu\text{l}$ を加え、同様に処理した。酢酸エチル $1.5\ \text{ml}$ を加えて1.5秒振盪させて酵素反応で生じた馬尿酸を抽出し、2*

* $0.00\text{r.p.m.}, 10\text{分間遠心分離し、酢酸エチル層}1.0\ \text{ml}$ を試験管に採取した。酢酸エチルをホットドライバスのなかで120°C、30分間加熱し完全に除去した後、室温で5分間放置した。そして、水 $1.0\ \text{ml}$ を加え、生成した馬尿酸の量を228nmの吸光度を測定して求めた。酵素反応に使用したアンジオテンシンI変換酵素含有液は、ラビットラングアセトンパウダー（シグマ社製）1gを0.1Mほう酸バッファー（pH8.3） $1.0\ \text{ml}$ に溶かしよく攪拌した後、4°C、4000×10gで40分間遠心分離した。その上澄を0.1Mほう酸バッファー（pH8.3）で希釈して作成した。アンジオテンシンI変換酵素阻害活性下記の式を使用して求めた。

【0014】

【数1】

$$(A-a) - (B-b)$$

$$\text{阻害率} = \frac{(A-a) - (B-b)}{(A-a)} \times 100$$

A：蒸留水添加時の吸光度 (228nm)

B：阻害剤添加時の吸光度 (228nm)

a, b：それぞれに対する盲検の吸光度 (228nm)

この方法で上記ペプチドのIC₅₀は、表1に示す結果となつた。

【0015】

【表1】

| アミノ酸配列 | IC ₅₀ (μM) | アミノ酸配列 | IC ₅₀ (μM) |
|--------|-----------------------|--------|-----------------------|
| L RW | 35.5 | F RP | 7.2 |
| L RF | 131.8 | F RW | 12.0 |
| L RY | 186.2 | F RF | 120.2 |
| I RF | 28.8 | F RY | 85.1 |
| I RY | 10.7 | F KW | 2.9 |
| I KF | 13.8 | F KF | 97.7 |
| | | F KY | 41.7 |

【0016】実施例2

以下に本発明の食品への実施例を示すが、本ペプチドの用途としては、以下の実施例に限定されるものではない。ペプチド含有ハンバーグを次のようにして作成した。牛肉3.0、鶏肉3.0、玉ねぎ2.5、ハン粉1.0、タマゴ4、でんぶん1の組成比重のハンバーグ6.0gあたりペプチドを1種類または2種類以上混合で5.0mg加え、よく混ぜ合わせた。その後、オーブンで焼き、ペプチド含有ハンバーグを作成した。このハンバーグのペプチド含有量は、ハンバーグを食する対象者によって増減可能である。

※【0017】

【発明の効果】以上説明したとおり、本発明によれば、新規なアンジオテンシンI変換酵素阻害ペプチドを合成し、食品に応用することができる。

【配列表】

【0018】配列番号：1

配列の長さ：3

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状（linear）

配列の種類：ペプチド（peptide）

5

配列: L e u A r g T r p
1

【0019】配列番号: 2

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状(linear)

配列の種類: ベプチド(peptide)

配列: L e u A r g P h e
1

【0020】配列番号: 3

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状(linear)

配列の種類: ベプチド(peptide)

配列: L e u A r g T y r
1

【0021】配列番号: 4

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状(linear)

配列の種類: ベプチド(peptide)

配列: I l e A r g P h e
1

【0022】配列番号: 5

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状(linear)

配列の種類: ベプチド(peptide)

配列: I l e A r g T y r
1

【0023】配列番号: 6

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状(linear)

配列の種類: ベプチド(peptide)

配列: I l e L y s P h e
1

【0024】配列番号: 7

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状(linear)

配列の種類: ベプチド(peptide)

配列: P h e A r g P r o
1

【0025】配列番号: 8

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状(linear)

配列の種類: ベプチド(peptide)

配列: P h e A r g T r p
1

* 【0026】配列番号: 9

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状(linear)

配列の種類: ベプチド(peptide)

配列: P h e A r g P h e
1

10 【0027】配列番号: 10

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状(linear)

配列の種類: ベプチド(peptide)

配列: P h e A r g T y r
1

【0028】配列番号: 11

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

20 トポロジー: 直鎖状(linear)

配列の種類: ベプチド(peptide)

配列: P h e L y s T r p
1

【0029】配列番号: 12

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状(linear)

配列の種類: ベプチド(peptide)

配列: P h e L y s P h e
1

【0030】配列番号: 13

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状(linear)

配列の種類: ベプチド(peptide)

配列: P h e L y s T y r
1